

天台鹅耳枥的组织培养与快速繁殖

陈 珍¹, 陈模舜¹, 孙骏威², 蒋 明¹

(1. 台州学院生命科学学院, 台州 318000; 2. 中国计量学院生命科学学院, 杭州 310018)

摘 要: 为了首次建立天台鹅耳枥的组织培养与植株再生体系, 以其茎段、未萌发的新芽及萌发后的嫩芽、叶片等为外植体进行离体培养试验。结果表明, 以新生的嫩芽为外植体, 成功诱导不定芽的分化与增殖, 最佳培养基配方为 1/2 MS+6-BA 2.0 mg L⁻¹+NAA 0.2 mg L⁻¹+PVP 0.2%。壮苗培养基配方为 1/2MS+6-BA 0.5 mg L⁻¹+NAA 0.05 mg L⁻¹; 最佳生根培养基配方为 1/4 MS+IBA 1.0 mg L⁻¹+NAA 0.1 mg L⁻¹。

关键词: 天台鹅耳枥; 组织培养; 不定芽增殖; PVP

中图分类号: S

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)06-0000-00

Tissue culture and rapid propagation of *Carpinus tientaiensis*

CHEN Zhen¹, CHEN Mo-shun¹, SUN Jun-wei², JIANG Ming¹

(1. College of Life Sciences, Taizhou University, Taizhou 318000; 2. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018)

Abstract: To establish a system of tissue culture and plantlet regeneration from *Carpinus tientaiensis*, stem segments, buds, or buds under germination and leaves were used as explants. The results showed that the optimum medium for induction and multiplication of adventitious shoots was 1/2 MS+6-BA 2.0 mg L⁻¹+NAA 0.2 mg L⁻¹+PVP 0.2% when buds was used as explants. The medium for cultivating strong seedling was 1/2 MS+6-BA 0.5 mg L⁻¹+NAA 0.05 mg L⁻¹, and the optimum medium for root regeneration was 1/4 MS+IBA 1.0 mg L⁻¹+NAA 0.1 mg L⁻¹.

Key words: *Carpinus tientaiensis*; tissue culture; multiplication of adventitious shoots; PVP

天台鹅耳枥 (*Carpinus tientaiensis*), 桦木科 (Betulaceae) 鹅耳枥属落叶乔木, 生于海拔 800~1 000 m 的山林中, 为浙江特有种^[1-2]。由于生境的严重碎化和繁殖能力较弱, 天台鹅耳枥濒临灭绝, 植株的数量十分稀少, 分布区域狭窄, 仅在天台华顶山西茅栅山坡林中存有 21 株, 分布面积约 0.3 hm², 处于极危状态, 被列为国家二级重点保护野生植物^[3-4]。天台鹅耳枥对研究桦木科植物地理、植物区系和生物多样性等方面均有重要的科研价值。目前国内有关天台鹅耳枥的研究还甚少, 陈贝贝等^[5]利用 ITS 序列进行了进化分析, 陈模舜等^[2]研究了其营养器官的解剖学结构, 但天台鹅耳枥的繁育尚未有前人研究。因此亟需深入开展天台鹅耳枥的育苗

和保护生物学研究。本文首次探究天台鹅耳枥的组织培养体系, 以期为其生物技术育种、种质资源保存、快速繁殖、人为控制生长发育等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及外植体的选择

2010 年冬末春初, 采集天台鹅耳枥 (*Carpinus tientaiensis*) 带芽枝条, 以饱满待萌发的新芽、刚萌发的嫩芽、茎段及幼嫩的叶片作为外植体, 进行组织培养研究。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的处理与接种 待萌发的新芽: 摘取含苞待放的新芽, 加少量洗洁精洗涤后流水冲洗,

收稿日期: 2013-01-

基金项目: 浙江省台州市科技计划项目 (071KY07) 资助。

作者简介: 陈 珍, 女, 博士, 讲师。E-mail: chenzh@tzc.edu.cn

于超净工作台前以 70%酒精消毒 60 s, 再用 0.1% HgCl_2 消毒 10 min, 最后以无菌水冲洗 6~8 次。接种时用无菌滤纸吸去残留水分, 直接接种, 或先在无菌培养皿上剥去外层叶片, 获得茎尖, 再接种到各种诱导培养基上。

带芽茎段: 剪取 1.0~2.0 cm 长的节段, 按上述方法清洗后酒精消毒 90 s, 升汞消毒 15 min, 无菌水冲洗后切取 0.5~1.0 cm 的茎段, 接种于各种诱导培养基上。

萌发的嫩芽: 枝条采回后于实验室插在水中, 置于阳光可见处, 春暖后新芽萌发, 剪取新生嫩芽以酒精消毒 30 s, 升汞消毒 8 min 后以无菌水冲洗, 接种于各种诱导培养基上。

叶片: 将新生的叶片灭菌处理后切成 0.5 cm × 0.5 cm 见方的叶盘, 接种于各种诱导培养基上。

1.2.2 培养基配方的选择 各种诱导培养基见表 2, 蔗糖为 3%, 琼脂为 0.7%。壮苗培养基为 S8: 1/2MS+6-BA 0.5 mg L^{-1} +NAA 0.05 mg L^{-1} 。生根培养基见表 1, 正交设计, 不含肌醇, 蔗糖为 2%, 琼脂 0.7%。

表 1 天台鹅耳枥不定根诱导培养基

培养基编号 Number of medium	基本培养基 Basic medium	NAA /mg L^{-1}	IBA /mg L^{-1}
R1	1/4 MS	0.1	1.0
R2	1/4 MS	0.5	0.5
R3	1/4MS	1.0	0.1
R4	1/2MS	0.1	0.5
R5	1/2MS	0.5	0.1
R6	1/2MS	1.0	1.0
R7	MS	0.1	0.1
R8	MS	0.5	1.0
R9	MS	1.0	0.5

表 2 不同培养基配方对天台鹅耳枥叶片愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of different culture media on callus induction from leaves of *C. tientaiensis*

培养基编号 Number of medium	基本培养基 Basic medium	6-BA /mg L^{-1}	NAA /mg L^{-1}	活性炭/% Activate carbon	聚乙烯吡咯烷酮 PVP /%	愈伤组织诱导率/% Induction rate of callus
S1	1/2 MS	0.05	0.1	0	0	30
S2	1/2 MS	0.5	0.5	0	0	100
S3	1/2 MS	1.0	0.1	0	0	50
S4	1/2 MS	2.0	0.2	0	0	0
S5	MS	2.0	0.2	0	0	77.78
S6	N6 大量+MS 微量 +B5 有机物	2.0	0.2	0.2	0	80

1.2.3 培养条件 外植体接种到相应培养基上, 置于温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照强度 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光照时间 12 h d^{-1} 的条件下培养。

1.2.4 炼苗和移栽 待植株健壮生根后, 打开培养瓶, 敞口适应 3 d, 洗去根部培养基, 栽植在基质中, 以保鲜膜覆盖保湿, 待苗健壮后移入山土中栽植。

1.2.5 统计分析 数据采用平均数 ± 标准差表示, 数据分析采用 DPS 软件进行 LSD 检验和方差分析, 显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 天台鹅耳枥不同外植体的诱导培养

以未萌发的芽苞和茎段直接接种, 容易滋生霉菌, 污染率高而诱导率低。剥取茎尖, 又易造成枯萎而未能获得芽的生长和增殖。以幼嫩叶片为外植体, 可获得愈伤组织, 但愈伤组织如何分化成芽, 还需实验探索。以萌发的嫩芽为外植体, 成功获得不定芽的增殖, 诱导率可达 100%。

2.2 不同培养基对天台鹅耳枥叶片愈伤组织形成的影响

叶片外植体接种到诱导培养基上, 叶片逐渐膨大, 在切口处可见致密的愈伤组织形成 (图 1), 但愈伤组织在继代时未能分化形成不定芽, 这还需要进一步的试验。从愈伤组织诱导率来看, 基本培养基为 1/2 MS 时, 细胞分裂素和生长素比例为 1:1 (6-BA 和 NAA 均为 0.5 mg L^{-1}), 愈伤组织形成率可达 100%; 6-BA 浓度过低, 愈伤组织的诱导率低; 而当 6-BA 达 2.0 mg L^{-1} 时, 与 NAA 0.2 mg L^{-1} 组合, 并不能诱导愈伤组织的形成 (表 2)。此时, 改变基本培养基成分, 可诱导愈伤组织形成, 当基本培养基为 MS 或者改良基本培养基的无机盐成分, 80% 左右的叶盘切口处能形成愈伤组织 (表 2)。

S7	1/2 MS	2.0	0.2	0.2	0	0
S8	1/2 MS	2.0	0.2	0	0.2	0

2.3 不同培养基对天台鹅耳枥新芽生长与不定芽增殖的影响

天台鹅耳枥枝条在实验室中扦插 15~30 d 后, 新芽萌发, 以新生芽为外植体, 成功避免了外植体的污染, 污染率降为 0。新芽存活后, 在不同培养基上可诱导其增殖形成不定芽。由表 3 可知, 6-BA 浓度过低, 不能启动不定芽的分化, 当 6-BA 浓度增加到 0.5~2.0 mg L⁻¹ 时, 能在一定程度上诱导不定芽的形成, 新芽分化获得一定数目的不定芽, 但增殖系数较低。提高 6-BA 浓度有利于促进芽的分化, 只是尽管 6-BA 浓度提高到 2.0 mg L⁻¹, 每个芽的增殖系数也只有 4~7, 且芽生长缓慢。改变基本培养基成分, 为 MS 全配方培养基或者调整后的配方(N6 大量+MS 微量+B5 有机物), 依然不利于不定芽的增殖。

表 3 不同培养基配方对天台鹅耳枥新芽分化启动与增殖的影响

Table 3 Effect of different culture media on axillary bud multiplication of *C. tientaiensis*

培养基编号 Number of medium	接种外植体数 Number of explants	新芽分化与增殖系数 Bud formation and proliferation coefficient
S1	20	1.00±0.00 d
S2	20	2.80±0.83 c
S3	20	5.20±0.45 b
S4	20	5.80±1.30 b
S5	20	1.00±0.00 d
S6	20	1.00±0.00 d
S7	20	1.00±0.00 d
S8	20	15.83±2.26 a

注: 同列中不同的小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

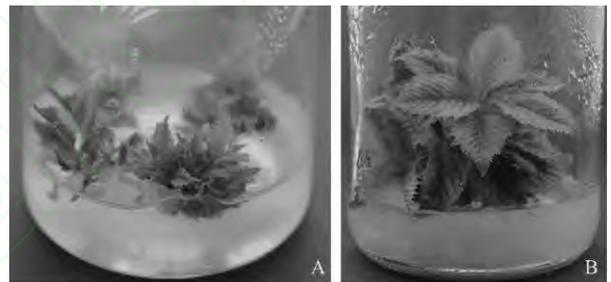
Notes: The different letters in the same column indicate significant difference at the 0.05 level.



图 1 天台鹅耳枥叶片诱导的愈伤组织

Figure 1 The callus induction from leaves of *C. tientaiensis*

虽然在外植体基部未见褐化现象, 但木本植物往往会分泌一些物质影响外植体的诱导或增殖, 因此我们在培养基中添加了活性炭(AC)或聚乙烯吡咯烷酮(PVP), 结果表明, 活性炭抑制了天台鹅耳枥不定芽的增殖, 而 PVP 却显著促进其不定芽的增殖, 半个月就可使增殖系数增加到 15.83, 极大地缩短了生长周期(图 2A)。因此天台鹅耳枥不定芽诱导和增殖的最佳培养基配方为: 1/2 MS+6-BA 2.0 mg L⁻¹+NAA 0.2 mg L⁻¹+PVP 0.2%。此外, 我们在后续的继代实验中还发现, 经过 PVP 处理后获得的不定芽在继代增殖时可不添加或减少 PVP 的添加, 仍有较好的增殖效果。



A: 不定芽的增殖; B: 壮苗培养

A: Multiplication of adventitious shoots; B: strong seedling culture

图 2 天台鹅耳枥不定芽的增殖与生长

Figure 2 The multiplication and growth of adventitious shoots of *C. tientaiensis*

2.4 天台鹅耳枥组培苗的壮苗与生根

切取天台鹅耳枥不定芽, 转至激素浓度降低的壮苗培养基(1/2 MS+6-BA 0.5 mg L⁻¹+NAA 0.05 mg L⁻¹)中, 一个月后幼苗健壮生长(图 2B)。然后转移至生根培养基中(图 3)。天台鹅耳枥较难生根。表 1 所设计的 9 种生根培养基配方, R1 最适合, 可使天台鹅耳枥的生根率达 67% 以上; R2 培养基上有 50% 左右的外植体生根, R3 仅有 33.3% 外植体生根, 而 1/2 MS 和 MS 均不能诱导天台鹅耳枥不定根的形成。



图 3 天台鹅耳枥不定根的诱导

Figure 3 The induction of adventitious roots of *C. tientaiensis*

2.5 天台鹅耳枥组培苗的炼苗与移栽

待试管苗健壮生根后,微开培养瓶盖进行炼苗。3 d 后取出并洗净根部附着的培养基,移入培养基质(蛭石:珍珠岩:松木屑=3:1:1)种植,初期以保鲜膜覆盖保湿。移栽成活率在 70% 以上。

3 小结与讨论

播种、扦插和嫁接等是目前木本植物常采用的育苗方式,但从已有的研究来看,同属的欧洲鹅耳枥种子繁殖过程复杂,如要在种子未成熟时收集,经过 3~4 个月的层积及变温处理,方能打破休眠,但发芽率仍不甚理想;欧洲鹅耳枥的木质部为散孔材,扦插繁殖生根困难,且技术要求较高^[6]。利用组织培养技术探索天台鹅耳枥的繁殖,可克服上述问题,实现濒危植物的种质资源保护。黄丽春等^[7-8]以普陀鹅耳枥的种胚和芽体为外植体,成功获得了普陀鹅耳枥的再生苗。我们以珍稀濒危植物天台鹅耳枥的茎段、未萌发的新芽及萌发后的嫩芽、叶片等为外植体进行离体培养试验,成功建立了再生体系。诱导愈伤组织的最佳外植体为新生叶片,最佳培养基为 $1/2 MS+6-BA 0.5 mg L^{-1}+NAA 0.5 mg L^{-1}$;诱导不定芽的最佳外植体为新生的嫩芽,最佳培养基配方为 $1/2 MS+6-BA 2.0 mg L^{-1}+NAA 0.2 mg L^{-1}+PVP 0.2\%$,增殖系数可达 15.83。经壮苗培养($1/2MS+6-BA 0.5 mg L^{-1}+NAA 0.05 mg L^{-1}$)后诱导生根,最佳生根培养基配方为 $1/4 MS+IBA 1.0 mg L^{-1}+NAA 0.1 mg L^{-1}$ 。

木本植物的特殊结构、细胞组成与木质化程度,均影响着其组织培养的成功率和生长周期。有报道认为,木本植物初代培养时无机盐浓度过高可引起酚类物质的大量外溢,影响芽的形成与生长,因而常采用低盐基本培养基如 $1/2MS$ 或 WPM ^[9-10]。本文研究表明,减少无机盐的用量,以 $1/2 MS$ 作为基本培养基,有利于天台鹅耳枥不定芽的增殖。

细胞分裂素与生长素是决定器官分化的关键物

质。1990 年,Chalupa^[11]成功地利用欧洲鹅耳枥的茎为初始外植体快繁出欧洲鹅耳枥植株,并发现附加高浓度的 BAP ($0.6\sim 1.0 mg L^{-1}$) 虽能促进不定芽的形成,但不定芽生长缓慢且较短,而低浓度的 BAP ($0.1\sim 0.2 mg L^{-1}$) 更有利于不定芽的形成与分化^[11]。我们在实验中却发现,不定芽诱导启动时,低浓度的 6-BA 并不利于天台鹅耳枥不定芽的形成与分化,提高 6-BA 浓度有利于提高增殖系数。但 6-BA 浓度高时芽的生长也是较短小,因此在壮苗时降低 6-BA 浓度,以实现茎的伸长和叶的生长(图 2B)。

目前,植物组织培养中采用的抗褐化剂主要有硫代硫酸钠、Vc 等抗氧化物质和活性炭、PVP 等吸附剂,但不同的抗褐化剂在不同植物种类组织培养过程中的作用存在差异^[12-13]。培养基中加入活性炭抑制了天台鹅耳枥不定芽的增殖和生长,可能活性炭具有较强的吸附能力,使得培养基内有效物质浓度降低而限制芽的增殖。PVP 为聚乙烯吡咯烷酮。顾福根等^[14]报道在培养基中加入一定量的 PVP 可有效防止白萼吊钟海棠外植体褐变,提高外植体的分化率和增殖倍数。本实验结果表明,PVP 对天台鹅耳枥不定芽的启动诱导起着十分重要的作用,能显著促进不定芽的增殖。但在乌药等植物的组织培养中,PVP 对芽的分化没有显著的促进效果^[15-16]。

试管苗生根时常通过降低培养基的营养元素、糖浓度来提高生根率;而且,由于肌醇对生根影响不大,某些条件下甚至起抑制作用,故而去除了^[17]。以 MS 或 $1/2 MS$ 为基本培养基,调整激素组合,均未能诱导天台鹅耳枥的生根。只有当无机盐降为 $1/4 MS$ 时,才可见天台鹅耳枥组培苗的生根。IBA 和 NAA 均为不定根诱导时常用的激素。从实验结果看,IBA 更利于促进天台鹅耳枥不定根的生长,因此选用 $1/4 MS+IBA 1.0 mg L^{-1}+NAA 0.1 mg L^{-1}$ 为最佳的生根培养基配方。

参考文献:

- [1] 林夏珍,楼炉煊. 浙江省国家重点保护野生植物资源[J]. 浙江林学院学报, 2002, 19(1): 31-35.
- [2] 陈模舜,柯世省,杨勇宇,等. 珍稀濒危植物天台鹅耳枥营养器官的解剖学研究[J]. 浙江林业科技, 2010, 30(5): 14-19.
- [3] 王昌腾,叶春林. 浙江省特有野生珍贵植物濒危原因及保护对策[J]. 福建林业科技, 2007, 34(2): 203-204.
- [4] 谢金华,林君阳,王国英,等. 天台县林木种质资源及保护利用[J]. 华东森林经理, 2009, 23(1): 54-58.
- [5] 陈贝贝,李温平,周晶,等. 天台山 4 种鹅耳枥属植物

- ITS 序列的克隆与分析[J]. 浙江农业学报, 2011, 23(6): 1107-1112.
- [6] 祝遵凌, 许园园. 欧洲鹅耳枥繁殖技术研究[J]. 安徽农业大学学报, 2012, 39(1): 88-91.
- [7] 黄丽春, 俞慈英, 张翠萍, 等. 普陀鹅耳枥芽体培养基及组培快繁方法[P]. 200810121614. X. 2008a.
- [8] 黄丽春, 俞慈英, 张翠萍, 等. 普陀鹅耳枥种胚培养基及组培快繁方法[P]. 200810121615. 4. 2008b.
- [9] 孙骏威, 陈珍, 李素芳, 等. 枳椇的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(7): 739-740.
- [10] 张翔宇, 杜亚填, 龚雪元. 南方红豆杉试管微芽诱导培养及其紫杉醇类化合物的积累[J]. 植物生理学报, 2012, 48(9): 864-868.
- [11] Chalupa V. Micropropagation of Hornbeam (*Carpinus betulus* L.) and Ash (*Fraxinus excelsior* L.)[J]. *Biologia Plantarum* (prana), 1990, 32 (5): 332-338.
- [12] 张明文, 陈力耕. 银杏组织培养中控制褐化的研究[J]. 中国南方果树, 2003, 32(3): 51-52.
- [13] 周音, 张智奇, 张建军, 等. 3 种抗氧化剂对茶条槭 (*Acer ginnala* Maxim.) 组织培养污染及褐化的影响[J]. 上海农业学报, 2007, 23(1): 5-7.
- [14] 顾福根, 陈瑞卿, 万志刚, 等. 白萼吊钟海棠的组织培养与快速繁殖[J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(3): 55-59.
- [15] 周俊辉, 王国彬, 曾浩森. 观赏凤梨嫩吸芽离体培养中褐化防止的初步研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2000, 13(1): 5-9.
- [16] 陈珍, 孙骏威, 许海丹, 等. 天台乌药的组织培养与快速繁殖[J]. 浙江农业学报, 2012, 24(2): 243-246
- [17] 徐涌, 孙骏威, 陈珍. 不同植物生长调节物质处理对吴茱萸组织培养的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2011, 28(3): 500-504.